

## 臍帯血T細胞の成人B細胞分化抑制能

### 〔II〕 臍帯血T細胞液性因子による免疫グロブリン産生の抑制 —ラテックス近赤外比濁法による培養上清免疫グロブリン量の測定—

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

森 谷 直 樹

(昭和55年5月10日受付)

〔II〕 本論文の要旨の一部は、第9回日本免疫学会総会 (1979, 東京) において発表した。

〔I〕編では臍帯血T細胞が、成人B細胞の *in vitro* での免疫グロブリン (Ig) 産生を強く抑制することを、蛍光抗体法を用いた細胞内 Ig 保有細胞数で検討した。〔II〕編では、Ig 産生細胞が培養液中に分泌する Ig 量を測定することにより、臍帯血T細胞の抑制能を評価することを試みた。沢井、右田ら<sup>1,2)</sup>が開発したラテックス近赤外比濁法 (LPIA) は、均一な直径のラテックス粒子に純度の高い抗体を感作しておき、抗原を含む試料に加えて抗原抗体反応を起こさせ、ラテックスが凝集する際に近赤外部 ( $0.9\mu\text{m}$ ) の光の透過度が低下することを利用して抗原量を定量する新しい方法である。この方法を用い、pokeweed mitogen (PWM) で刺激したリンパ球が培養上清中に分泌する Ig 量の測定を試み、さらに双子培養管を使用して、透析膜で成人末梢血リンパ球 (PBL) から隔てた臍帯血T細胞が、液性因子を介して成人B細胞の分化を抑制し得るかを、成人PBLの培養上清の Ig 量を測定することで検討した。

#### 材 料 と 方 法

##### 1. リンパ球の分離

臍帯血及び成人静脈血をヘパリンを加えて採血し、〔I〕編で述べたごとく Ficoll-Hypaque 比重遠心法でリンパ球を分離した。

##### 2. 臍帯血T細胞の分離

〔I〕編で述べたごとく、ノイラミニダーゼ処理した羊赤血球と臍帯血リンパ球を混合し E ロゼット形成を行わせ、Ficoll-Hypaque 比重遠心にて pellet に T 細胞に富む population を得た。

##### 3. 培養条件

20% 胎児牛血清 (FCS, GIBCO) を含む RPMI1640 培養液 (GIBCO) にリンパ球  $1 \times 10^6/\text{ml}$  の濃度で浮遊し、培養チューブ ( $13 \times 100\text{ mm}$ , Falcon) に  $1\text{ ml}$  入れ、種々濃度の PWM を加え、 $37^\circ\text{C}$  5%  $\text{CO}_2$  濃度の培養器で種々期間培養した。

##### 4. 培養上清の回収

リンパ球を培養後、 $400 \times g$ , 10 分間遠心し細胞が混入しないように培養上清を回収して測定まで  $-20^\circ\text{C}$  で保存した。

##### 4. 培養液上清中の Ig 量の測定

Ig 量の標準曲線を作製するために、ヘキストの QS 血清  $150\mu\text{l}$  を 20% FCS を含む RPMI1640 培養液で倍々希釈し、 $2^{10}$  倍までの希釈系列をつくり、それぞれ  $0.6\text{ ml}$  と 0.1% ラテックス試薬 (抗ヒト IgM, IgG, IgA 家兎抗体感作)  $1\text{ ml}$  をキューベットに入れ、直ちに円形スターラーでかくはんしながら  $0.9\mu\text{m}$  の波長の光の透過度の変化を測定した。抗原抗体反応によりラテックスが凝集すると近赤外部の光は透過度が減少、

Suppressor activity of cord blood T lymphocytes on adult B cell differentiation in the pokeweed mitogen system. [II] Suppression of immunoglobulin production by humoral factors derived from cord blood T lymphocytes. —Quantitative measurement of immunoglobulins in the culture supernatant of lymphocytes by latex photometric immunoassay—  
**Naoki Moriya**, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan.

つまり濁度が上昇する。抗原量が多い場合は、抗原抗体反応の初速度で測定が可能（3分間）であり、rate method という。抗原量が少ない場合はさらに室温に3時間又は21時間放置し、抗原抗体反応を充分に進行させてから光の透過度の変化を求めてIg量を決定した（end point method）。リンパ球培養上清は20% FCSを含む培養液で2倍希釈し、0.6 ml ずつ IgM, IgG, IgA の測定に供した。

#### 5. 培養上清 Ig の回収実験

測定したIg量の信頼性を検定するために、既にIg量を測定した培養上清に、標準曲線用に作製したQS

血清のあるIg量の希釈液を等量加え、計算上の期待値と実測値の比較を行った。

#### 6. 双子培養管を用いた臍帯血T細胞の成人B細胞分化に及ぼす影響

交通可能な双子培養管（図1）を透析膜で隔て、一方に成人PBL  $1 \times 10^6/2 \text{ ml}$ 、他方に臍帯血T細胞  $2 \times 10^6/2 \text{ ml}$  を入れ、それぞれ PWM  $5 \mu\text{l}/\text{ml}$  を加えて培養を開始した。培養開始後6, 12, 24, 48, 72時間目に臍帯血T細胞を除き、PWMを含む新鮮培養液2 ml で置換した。計7日間培養し、成人PBLの培養上清を回収しIg量を測定した。同時に細胞も回収し、蛍光抗体法によりIg産生細胞数を算定した。

### 成 績

#### 1. Ig量の標準曲線

IgM, IgG, IgA についての標準曲線を図2, 3, 4に示した。縦軸は absorbance/min, 横軸は1 mlあたりのIg量である。3分はrate method, 3時間, 21時間はend point method による測定範囲を示している。Rate method ではIgMで  $2 \mu\text{g}/\text{ml}$  から  $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ , IgGで  $0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$  から  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ , IgAで  $0.3 \mu\text{g}/\text{ml}$  から  $4 \mu\text{g}/\text{ml}$  の範囲で測定可能であった。End point method ではIgMで  $50 \text{ ng}/\text{ml}$  から  $2,000 \text{ ng}/\text{ml}$ , IgGで  $10 \text{ ng}/\text{ml}$  から  $800 \text{ ng}/\text{ml}$ , IgAで  $50 \text{ ng}/\text{ml}$  から  $1,000 \text{ ng}/\text{ml}$  の範囲で測定可能であった。20% FCSを含む培養液単独では、IgM, IgG, IgAともに検出されず、FCSはこのassay systemでは問題にならなかった。

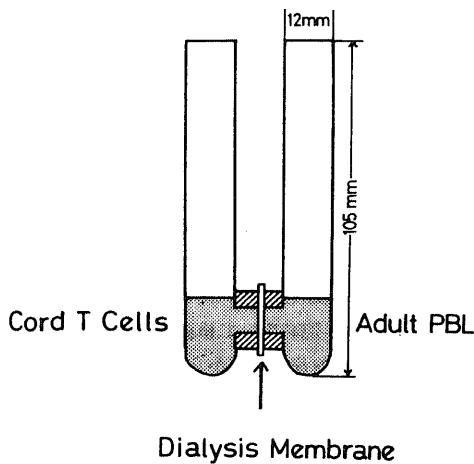


Fig. 1. Twin-culture tube.

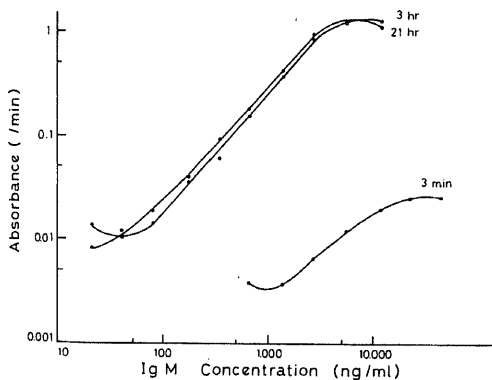


Fig. 2. Standard curves for IgM. "3 min" indicates the standard curve evaluated by rate method of latex photometric immunoassay (LPIA). "3 and 21 hr" indicate the standard curves evaluated by end point method of LPIA.

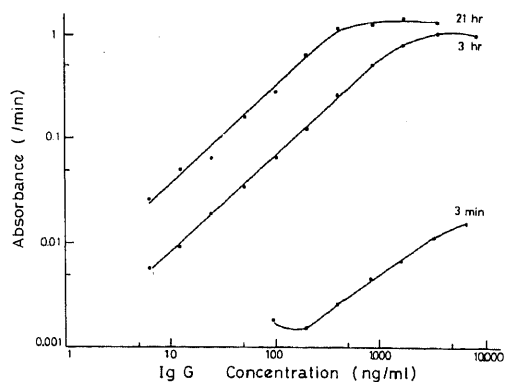


Fig. 3. Standard curves for IgG. "3 min," indicates the standard curve evaluated by rate method of latex photometric immunoassay (LPIA). "3 and 21 hr" indicate the standard curves evaluated by end point method of LPIA.

## 2. リンパ球培養上清の Ig 量

種々濃度の PWM を加えて 7 日間培養し、それぞれの培養上清について Ig 量を測定した。図 5 に示したように、 $5 \mu\text{l}/\text{ml}$  の PWM を添加することで各クラスの Ig 量の分泌が最大となった。これは [I] 編で述べた蛍光抗体法における PWM の至適濃度と同一であった。以下の実験はすべて  $5 \mu\text{l}/\text{ml}$  の PWM を使用した。

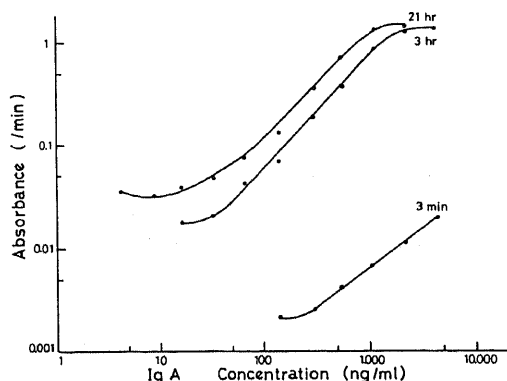


Fig. 4. Standard curves for IgA. "3 min" indicates the standard curve evaluated by rate method of latex photometric immunoassay (LPIA). "3 and 21 hr" indicate the standard curves evaluated by end point method of LPIA.

次に培養開始後 1, 3, 5, 7, 9 日目までに培養液中に分泌される Ig 量を測定した。図 6 にその結果を示したが、IgM, IgG は培養開始後 3 日目に PWM の添加の有無に関係なくかなりの量の Ig が検出され、5 日目には減少し、7, 9 日目と PWM 存在下で Ig の著しい分泌が認められた。IgA の分泌はやや遅れ 9 日目から PWM 存在下で増加するようであった。脐帯血リンパ球を同様の条件で培養し、培養上清中の Ig 量を測定したが、図 7 に示したように 9 日間にわたって  $100 \text{ ng}/\text{ml}$  前後とごく微量の Ig 量しか検出されず、PWM 添加の有無による差も認められなかった。

## 3. 培養上清 Ig 量の回収実験

成人 PBL 培養上清 2 検体につき Ig の回収実験を行った (表 1)。IgG, IgA についてはほぼ期待値と実測値が等しかったが、IgM は実測値が期待値をやや上回った。

## 4. 双子培養管を用いた脐帯血 T 細胞の成人 B 細胞分化に及ぼす影響

脐帯血 T 細胞は [I] 編で示したように、成人 PBL との混合培養において、成人 B 細胞が Ig 産生細胞へ分化するのを強く抑制した。この脐帯血 T 細胞の抑制能が細胞間の接触なしに透析膜を隔てて伝達されるかどうかを双子培養管を用いて検討した。図 8 に結果を示したが、双子培養管の一方から培養開始後 24 時間以内に脐帯血 T 細胞を除くと、成人 PBL による Ig 産生

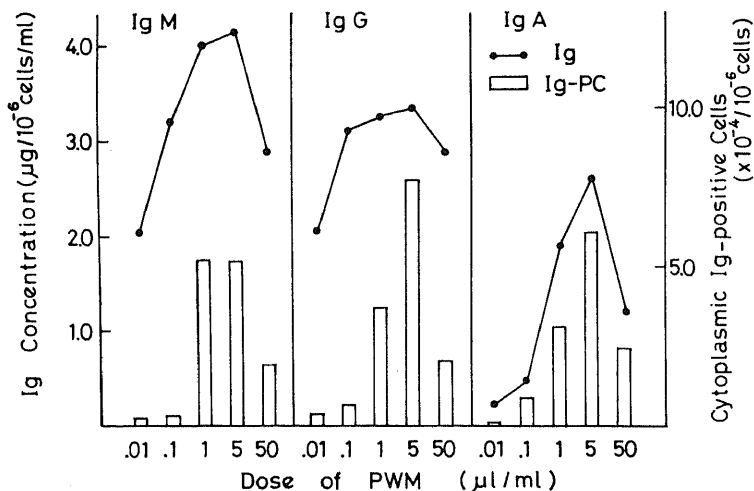


Fig. 5. Dose effect of pokeweed mitogen on the immunoglobulin production in the culture supernatant of adult peripheral blood lymphocytes ( $1 \times 10^6 / \text{ml}$ ). The number of immunoglobulin-producing cells in the same culture was simultaneously detected.

は抑制されないが、24 時間以降に除去すると成人 PBL による Ig 産生は著明に抑制された。同じ検体で Ig 産生細胞数も算定したところ、培養上清の Ig 量とよく相関した。

### 考 察

リンパ球培養上清中の Ig の定量は現在主に radio-immunoassay によって測定されている<sup>3)-5)</sup>。しかしこの方法は使用施設に限られるという問題がある。沢井、

右田らが開発した LPIA 法で培養上清中の Ig 量が測定可能かどうかを検討したところ、IgG で 10ng/ml、IgM、IgA で 50ng/ml と極めて低濃度の Ig 量の測定が可能であり、radioimmunoassay による測定感度に比肩し得ると思われた。又、培養上清 Ig の回収実験においても IgG、IgA は良好な回収率が得られた。IgM について期待値より実測値がやや高い傾向にあったが、抗原抗体反応に伴う凝集力価の相違など、今後の検討が必要と思われた。成人 PBL の経時的な培養

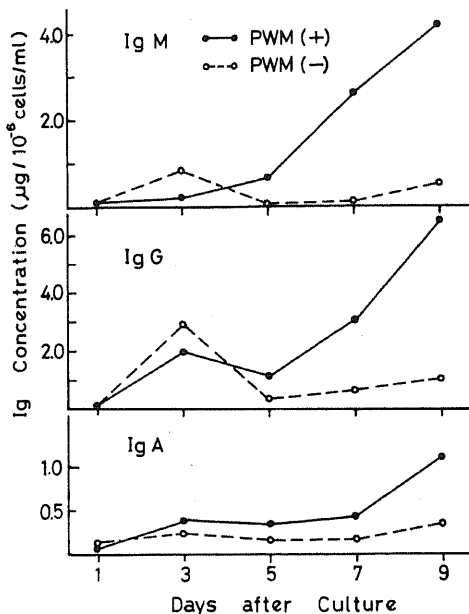


Fig. 6. Immunoglobulin production in the culture supernatant of adult peripheral blood lymphocytes ( $1 \times 10^6$ /ml) at various time intervals after pokeweed mitogen stimulation ( $5 \mu\text{l/ml}$ ).

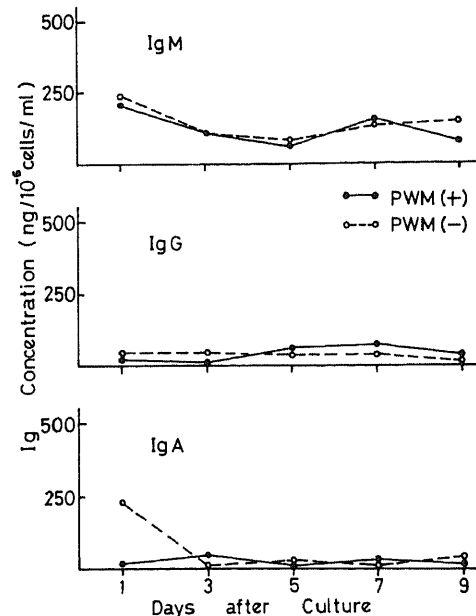


Fig. 7. Immunoglobulin production in the culture supernatant of cord blood lymphocytes ( $1 \times 10^6$ /ml) at various time intervals after pokeweed mitogen stimulation ( $5 \mu\text{l/ml}$ ).

Table I. Recovery assay of immunoglobulins in the supernatant of PWM-stimulated adult lymphocytes culture<sup>a)</sup>

Class of Ig	Adult 1		Adult 2	
	predicted	examined (recovery %)	predicted	examined (recovery %)
Ig M	4169ng	5044ng (121%)	6093ng	8024ng (132%)
Ig G	1000	864 (86.4%)	4086	4085 (99.9%)
Ig A	1382	1115 (80.7%)	324	350 (108%)

<sup>a)</sup> One volume of the supernatants of PWM-stimulated adult lymphocytes which had been determined of their Ig amounts (ng/ml) and one volume of standard QS serum were mixed. Ig amounts of these mixtures were evaluated by latex photometric immuno-assay and compared with their predicted values.

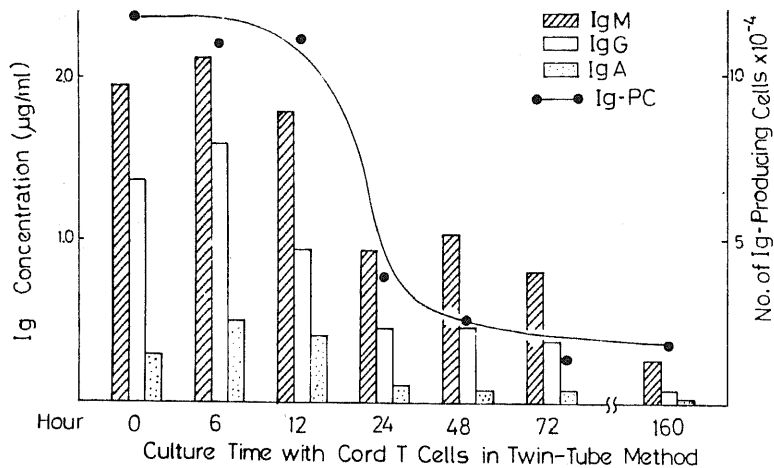


Fig. 8. Suppressor activity of cord T cells on adult B cell differentiation in the twin-culture tube method.  $1 \times 10^6$  adult peripheral blood lymphocytes and  $2 \times 10^6$  cord T cells were cultured in the twin-culture tubes with pokeweed mitogen. Then, cord T cells were removed from one of the twin-tubes at various time intervals of culture and replaced with fresh medium containing pokeweed mitogen. On day 7 of culture, immunoglobulin amounts in the culture supernatant of adult peripheral blood lymphocytes were detected. The number of immunoglobulin-producing cells in the same culture was simultaneously detected.

上清 Ig 量については、3 日目に PWM の添加の有無に関係なくかなりの量の Ig が検出されるが、リンパ球の崩解によって出てきたものか由来は不明である。蛍光抗体法では培養開始後 5 日目に Ig 産生細胞数の増加がみられるが、Ig の分泌は 7 日目とやや遅れるようであった。臍帯血リンパ球の培養上清中には Ig 分泌がほとんど認められず、蛍光抗体法による結果と合致した。

Olding ら<sup>6)</sup>は、臍帯血 T 細胞が液性因子を介して母親の末梢リンパ球の種々 mitogen に対する分裂増殖を抑制することを報告した。双子培養管を用いた実験から、臍帯血 T 細胞は透析膜を隔てて成人 B 細胞の Ig 産生を抑制することが示され、透析可能な液性因子の存在が強く示唆された。培養開始後、経時的に臍帯血 T 細胞を除くことにより、24 時間前後とかなり早期にこの液性抑制因子が分泌されることが想定された。

## 結 論

1. ラテックス近赤外比濁法により、リンパ球培養上清中に分泌された Ig 量を測定することができた。IgM, IgA は  $50 \text{ ng/ml}$ , IgG は  $10 \text{ ng/ml}$  と極めて低濃度まで測定可能であり、回収実験からも信頼性が高いと考えられた。

2. 成人 PBL の培養上清中の IgM, IgG 量は PWM 刺激後 7 日目から著明に増加し、IgA はやや遅れて 9 日目から増加した。蛍光抗体法による Ig 産生細胞数の増加よりやや遅れる傾向にあった。臍帯血リンパ球の培養上清中には 9 日間にわたって  $100 \text{ ng/ml}$  前後と極めて少量の Ig しか検出できなかった。

3. 双子培養管を用いた実験から、臍帯血 T 細胞は PWM 刺激により透析可能な液性因子を介して成人 B 細胞の分化を抑制することが示唆され、しかもこの液性抑制因子はかなり早期 (24 時間前後) に分泌されると思われた。

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲下さいました恩師谷口昂教授、金沢大学癌研究所分子免疫部、右田俊介教授に深く感謝いたします。また常に多大なご協力をいただきました奥田則彦講師、宮脇利男先生はじめ小児科第 2 研究室の諸兄、並びに教室員の皆様に感謝いたします。最後に、臍帯血をご提供下さいました金沢聖霊病院産婦人科、大下陸郎先生に深謝いたします。

## 文 献

1. 沢井政信・須藤忠満・奥村一・森田司郎・佐藤茂・松本紳一郎・右田俊介：ラテックス凝集反応の近赤外比濁法によるイムノアッセイ。臨床化学シンポジ

ウム vol. 18.(1978)

2. 沢井政信: ラテックス近赤外比濁法: 原理とFDP, hCG の測定. 免疫実験操作法Ⅷ, 2393 - 2400(1979)
3. Waldmann, T. A., Durm, M., Broder, S., Blackman, M., Blaese, R. M. & Strober, W. : Role of suppressor T cells in pathogenesis of common variable immunodeficiency. *Lancet*, **2**, 609-613(1974).
4. Broder, S., Hunphery, A., Durm, M., Blackman, M., Goldman, C., Strober, W. & Waldmann, T. A. : Impaired synthesis of polyclonal (non-paraprotein) immunoglobulins by circulating lymphocytes from patients with multiple myeloma : role of suppressor cells. *New Eng. J. Med.*, **293**, 887-892(1975).
5. Thomas, A., Platta-Mills, E. & Ishizaka, K. : IgG and IgA diphtheria antitoxin responses from human tonsil lymphocytes. *J. Immunol.*, **114**, 1058-1064(1975).
6. Olding, L. B., Murgita, R. A. & Wigzell, H. : Mitogen-stimulated lymphoid cells from newborns suppress the proliferation of maternal lymphocytes across a cell-impermeable membrane. *J. Immunol.*, **119**, 1109-1114(1977).

**Suppressor Activity of Cord Blood T Lymphocytes on Adult B Cell Differentiation in the Pokeweed Mitogen System [II] Suppression of Immunoglobulin Production by Humoral Factors Derived from Cord Blood T Lymphocytes —Quantitative Measurement of Immunoglobulins in the Culture Supernatant of Lymphocytes by Latex Photometric Immunoassay—** Naoki Moriya  
Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920, Japan. J. Juzen Med. Soc., 89, 362–368 (1980).

**Abstract** In this study, immunoglobulin (Ig) amounts in the culture supernatant of pokeweed mitogen (PWM)-stimulated adult peripheral blood lymphocytes (PBL) were evaluated by using latex photometric immunoassay (LPIA), a new immunological method of quantitative measurement of antigens or antibodies by applying the near infrared turbidimetry to the latex agglutination reaction. And, using this method, the suppressor activity of cord T cells was assessed in the twin-culture tubes in which cord T cells and adult PBL were separated from each other by dialysis membrane and cultured with PWM.

1. The minimum detectable amounts of Igs by LPIA were as follows: IgM and IgA, 50 ng/ml and IgG, 10 ng/ml using 0.6 ml samples. 20% fetal calf serum contained in the culture medium had not affected the Ig amounts of the culture supernatant.  $1 \times 10^6$ /ml adult PBL were cultured with 5  $\mu$ l/ml of PWM at various time intervals. IgM and IgG amounts in the culture supernatant of adult PBL increased on 7th day after PWM stimulation (894–8,282 ng/ml). IgA was secreted more slowly and increased on 9th day after PWM stimulation (630–2,377 ng/ml). In the culture supernatant of cord blood lymphocytes, negligible amounts of Igs (about 100 ng/ml) were detected throughout the culture periods. Recovery rate of Igs in the culture supernatant ranged from 80.7% to 132%.

2. In the twin-culture tube assay, cord T cells in one of the twin tubes were removed and replaced with fresh medium containing PWM at various time intervals after PWM stimulation. When cord T cells were removed at 24 hr or later of culture, Ig production in the culture supernatant of adult PBL was markedly suppressed. This result suggested that the suppressor activity of cord T cells on adult B cell differentiation could be mediated by dialyzable humoral factors which were secreted by cord T cells in the early phase of PWM stimulation.